

Molekulare Medizin

Die Blut-Hirn Schranke und die Therapie lysosomaler Erkrankungen

HANS-JOACHIM GALLA¹, VOLKMAR GIESELMANN²

¹INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, WESTFÄLISCHE-WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

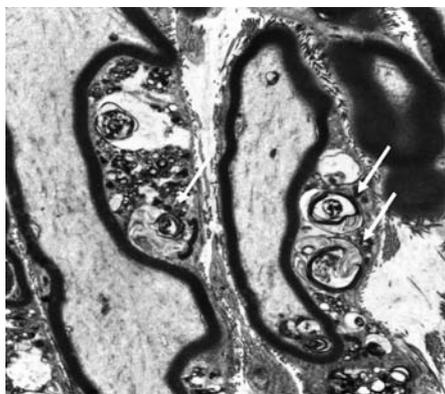
²INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE, RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN

Der intravenöse Enzymersatz ist eine Therapieoption für lysosomale Speichererkrankungen. Da injizierte Enzyme die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, ist die bei vielen Erkrankungen dominierende zentralnervöse Symptomatik aber bisher therapierefraktär. Um die Therapie zu verbessern wird die Transzytose lysosomaler Enzyme über die Blut-Hirn-Schranke in einem *in vitro*-Modell untersucht.

Intravenous enzyme replacement is a therapeutic option for lysosomal storage diseases. Because injected enzymes cannot pass the blood brain barrier, the neurologic pathology dominating many diseases is refractory to treatment. To improve therapy, transcytosis of lysosomal enzymes across the blood brain barrier will be investigated in an *in vitro* model.

Lysosomale Speichererkrankungen

■ Lysosomen sind Organellen, die extra- wie intra-zelluläre Moleküle degradieren und die dabei frei werdenden Bausteine der Zelle erneut für die Biosynthese zur Verfügung stellen. Die abzubauenen Moleküle erreichen



▲ **Abb. 1:** Lysosomales Speichermaterial in einer Schwann-Zelle des peripheren Nervensystems bei einer genetischen Defizienz von Hydrolasen. Einige der speichernden Lysosomen sind mit weißen Pfeilen markiert. Bild aus einer Kooperation mit Prof. R. Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut, Universität Kiel.

das Lysosom über mehrere Wege. Intrazelluläre Substanzen gelangen über Autophagozytose in den lysosomalen Abbauweg. Zytoplasmatische Proteine können direkt über die lysosomale Membran in das Lysosom übergehen. Extrazelluläre Substanzen werden endo- oder phagozytiert und in die Lysosomen transportiert. Zur Degradation der strukturell sehr unterschiedlichen Substanzen verfügt das Lysosom über ein großes Spektrum an Hydrolasen. Bei genetisch bedingten Defizienzen der Hydrolasen können bestimmte Substanzen nicht mehr abgebaut werden und akkumulieren (**Abb. 1**). Die daraus resultierenden Erkrankungen bezeichnet man als lysosomale Speichererkrankungen, von denen es etwa 50 verschiedene Krankheitsbilder gibt (**Tab. 1**)^[1]. Je nach betroffener Hydrolase bzw. Degradationsweg können lysosomale Erkrankungen weiter unterteilt werden. Defizienzen von Enzymen, die am Abbau von Glycosaminoglycanen (früher als Mucopolysaccharide bezeichnet) beteiligt sind, führen zu Mucopolysaccharidosen. Defekte in der Sphingolipiddegradation liegen der Erkrankungsgesgruppe der Lipidosen zugrunde^[1]. Wegen des unterschiedlichen klinischen Erschei-

nungsbildes lysosomaler Erkrankungen fallen allgemeine Aussagen zu Symptomen schwer. Viele Patienten zeigen eine durch die Speicherung vergrößerte Leber und Milz. Patienten mit Mucopolysaccharidosen leiden an ausgeprägten Skelett- und Knorpelveränderungen sowie an einer Beeinträchtigung des Nervensystems. Bei Lipidosen sind Skelettveränderungen seltener, dafür stehen umso massivere neurologische Symptome im Vordergrund. In den meisten Fällen führen die Erkrankungen noch im Kindesalter zum Tod.

Enzymersatztherapie lysosomaler Speichererkrankungen

Lysosomale Speichererkrankungen galten viele Jahre als ursächlich nicht therapierbar. Diese Situation hat sich in den letzten Jahren geändert und einige wenige dieser Erkrankungen sind heute durch eine Enzymersatztherapie zu behandeln (**Tab. 1**). Dabei wird den Patienten das ihnen fehlende Enzym intravenös verabreicht. Das Konzept dieser Enzymersatztherapien beruht auf den Besonderheiten der intrazellulären Sortierung lysosomaler Enzyme. Lysosomale Enzyme tragen auf ihren N-gebundenen Oligosaccharidseitenketten Mannose-6-Phosphat-Reste, über die sie an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, die auf den Plasmamembranen fast aller Zellen vorhanden sind, binden können. Intravenös injizierte Enzyme binden an diese Rezeptoren, werden endozytiert, in die Lysosomen transportiert und begeben dort den metabolischen Defekt^[2]. Vergleichbare Wege gibt es für z. B. peroxisomale und mitochondriale Proteine nicht, so dass mit Defizienzen dieser Proteine verbundene Krankheiten einem vergleichbar einfachen Enzymersatzverfahren nicht zugänglich sind. Die Enzymersatztherapie ist insbesondere für die wenigen lysosomalen Speichererkrankungen ohne zentralnervöse Beteiligung geeignet, da allgemein angenommen wird, dass intravenös injizierte Enzyme die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht überwinden können. Leider werden die meisten lysosomalen Speichererkrankungen von massiven neurologischen

Tab. 1: Beispiele lysosomaler Speichererkrankungen aus verschiedenen Untergruppen. EET: Enzyersatztherapie verfügbar (+) oder im fortgeschrittenen Stadium der Entwicklung (*). Die Abkürzungen GM2, GD1a, GM1, GA2 stehen für die entsprechenden Ganglioside.

Erkrankung	Fehlendes Enzym	EET	Speichermaterial
Mucopolysaccharidosen (MPS)			
MPS I (Hurler, Scheie)	α -Iduronidase	+	Dermatansulfat und Heparansulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatase	+	Dermatansulfat und Heparansulfat
MPS IIIA (Sanfilippo)	Heparan N-sulfatase (sulfamidase)		Heparansulfat
MPS IIIB (Sanfilippo)	N-Acetyl- α -glucosaminidase		Heparansulfat
MPS IIIC (Sanfilippo)	Acetyl-CoA: α -glucosamid N-acetyltransferase		Heparansulfat
MPS IIID (Sanfilippo)	N-Acetylglucosamin-6-sulfatase		Heparansulfat
MPS IV A (Morquio-A)	N-Acetylgalactosamin-6-sulfatase	*	Keratansulfat, Chondroitin-6-sulfat
MPS IV B (Morquio-B)	β -Galactosidase		Keratansulfat, Oligosaccharide
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetylgalactosamin-4-sulfatase	+	Dermatansulfat
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidase		Heparansulfat, Dermatansulfat, Chondroitin-4- und -6-sulfat
Lipidosen			
Morbus Fabry	α -Galactosidase A	+	Globotriaosylceramid, Galabiosylceramid, Blutgruppe-B Glykolipide
Morbus Gaucher	β -Glucosidase	+	Glucosylceramid, Glucosylsphingosin
Globoidzell Leukodystrophie (Krabbe)	Galaktocerebrosid β -Galaktosidase		Galactosylceramid, Psychosin
Metachromatische Leukodystrophie	Arylsulfatase A	*	Sulfatid, 3-O-Sulfolactosylceramid, Lysosulfatid
Niemann-Pick A and B	Sphingomyelinase		Sphingomyelin, Cholesterol
GM1 gangliosidosis	β -Galactosidase		GM1, GA1, Lactosylceramid, Oligosaccharide, Keratansulfat
GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase A		GM2, GD1aGalNac, GA2, lyso-GM2
GM2 gangliosidosis (Sandhoff)	β -Hexosaminidase A and B		GM2, GD1aGalNac, Globosid, Oligosaccharide, lyso-GM2
Oligosaccharidosen und Glycoproteinosen			
Aspartylglucosaminurie	Aspartylglucosaminidase		Aspartylglucosamin
Fucosidose	α -Fucosidase		Fucose enthaltende Oligosaccharide
α -Mannosidose	α -Mannosidase	*	Mannose-enthaltende Oligosaccharide
β -Mannosidose	β -Mannosidase		Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc Disaccharid
Glycogenspeichererkrankung			
Morbus Pompe (Glycogenspeichererkrankung Typ II)	α -Glucosidase	+	Glykogen

Symptomen dominiert, so dass die Effizienz der Enzyersatztherapie bei vielen Krankheitsbildern durch die BHS begrenzt wird.

Die Blut-Hirn-Schranke: eine lebenswichtige, aber medizinisch ambivalente Barriere

Die BHS kontrolliert den Stoffaustausch zwischen dem Blutkreislauf und der cerebralen Interstitialflüssigkeit. Diese Schrankenfunktion ist in den cerebralen Kapillaren lokalisiert, die von einem spezialisierten Endothel ausgekleidet sind. Sie sind Bestandteil der neurovaskulären Einheit, ein komplexes zelluläres Verbundsystem mit Gliazellen und Neuronen^[3]. Diese erstmals 1885 von Paul Ehrlich beschriebene Barrierefunktion garantiert die

Konstanz der chemischen Zusammensetzung der interstitiellen Gehirnflüssigkeit. Diese Schutzfunktion ist lebenswichtig zum Erhalt der empfindlichen elektrischen und chemischen Signalwege im Gehirn, aber auch im Hinblick auf neurotoxische Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen werden. Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) verschließen den interzellulären Spalt, so dass wasserlösliche Substanzen das BHS-Endothel nur über den transzellulären Weg überqueren können. Einige Gase (O_2 , CO_2) und kleine lipophile Moleküle können die Barriere durch passive Diffusion über die Plasmamembran durchdringen. Für hydrophile und große Moleküle (> 5 kDa), wie z. B. Enzyme in einer Enzyersatztherapie, stellt das cerebrale Endothel eine zunächst

unüberwindbare Barriere dar. Spezifische Transportsysteme übernehmen jedoch die Nährstoffversorgung für kleine Moleküle wie Glucose, Aminosäuren oder Nukleoside^[4]. Große Moleküle können durch eine, wenn auch gering ausgeprägte, Rezeptor-vermittelte Endozytose selektiv in das Gehirn überführt werden (z. B. Insulin und Transferrin). Daneben sorgen aktive Transporter unter Verwendung von ATP für einen Rücktransport von in die Endothelzellen eingedrungenen körpereigenen, aber auch körperfremden Substanzen. Diese ABC-Transporter bauen die Multi Drug Resistance auf, eine wichtige Schutzfunktion für das Gehirn.

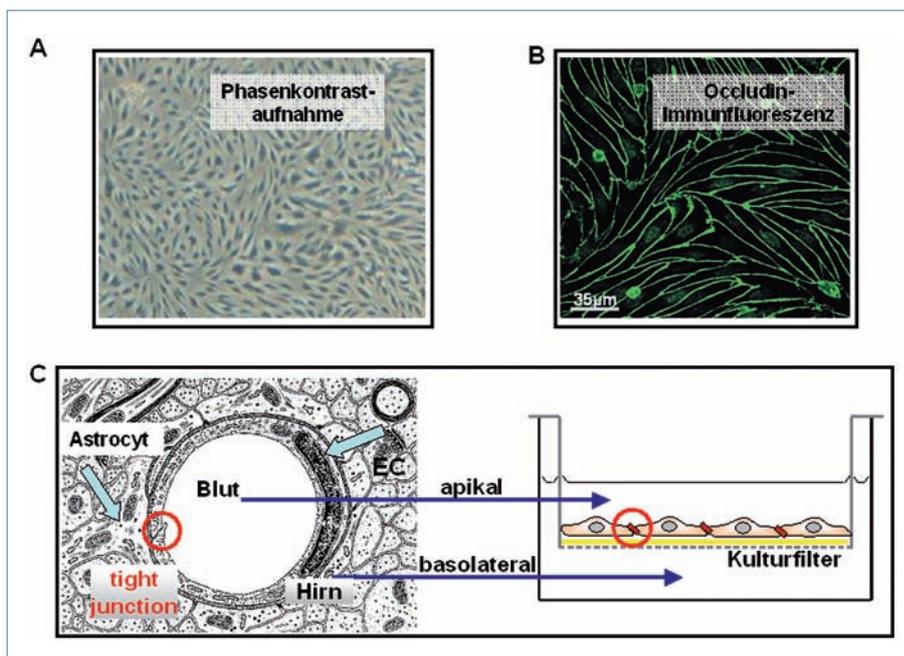
Die Schrankenfunktion des cerebralen Endothels ist somit medizinisch ambivalent.

Sie schützt einerseits das Gehirn vor Schwankungen in der Zusammensetzung des Blutplasmas und vor dem ungewollten Eintritt von Fremdstoffen, verhindert aber dadurch auch die Aufnahme von Wirkstoffen. Deshalb können viele cerebrale Erkrankungen wie Hirninfektionen oder Tumore des ZNS nur schwer oder durch extrem hohe Wirkstoffkonzentrationen im Blut behandelt werden. Dies gilt auch für die Enzymersatztherapie lysosomaler Erkrankungen.

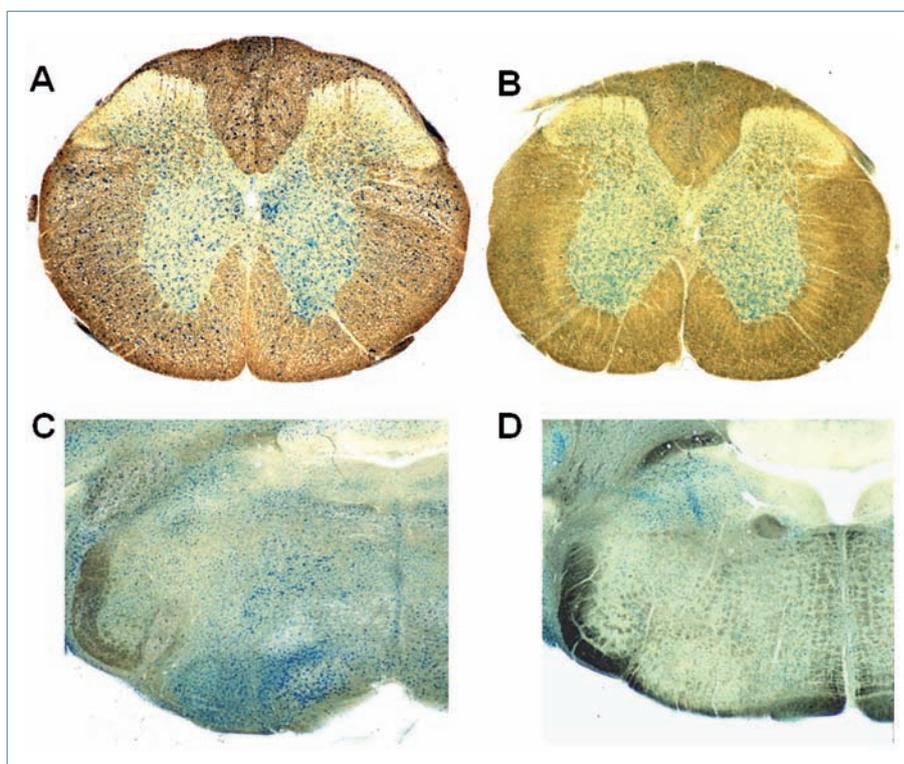
In vitro-Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Eine Reihe therapeutischer Versuche an Tieren mit lysosomalen Speichererkrankungen haben gezeigt, dass es in vielen Fällen entgegen den Erwartungen auch im ZNS nach Enzyminjektion zu einer Verminderung des Speichermaterials kommt^[5, 6]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass lysosomale Enzyme die BHS möglicherweise doch durch eine von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren vermittelte Transzytose überwinden können^[7]. Ein Verständnis der Mechanismen und Wege, wie intravenös injizierte Enzyme trotz der BHS die Speicherung im Gehirn positiv beeinflussen können, ist für die Optimierung der Therapie unerlässlich. Die dafür notwendigen systematischen Untersuchungen bedürfen eines *in vitro*-Systems der BHS, da Gesamtorganismen hochkomplexe Einheiten darstellen, die häufig wegen der Interferenz verschiedener Bausteine eine eindeutige molekulare Zuordnung nicht zulassen. Um ein System auf eine kontrollierbare Einheit zu reduzieren, werden zelluläre *in vitro*-Modelle verwendet, die zwar nur eingeschränkt das physiologische System ersetzen, aber dafür weniger aufwendig in den Kosten und in der Handhabung, bei der Interpretation der Daten eindeutiger und bei entsprechender Validierung dennoch nahe genug am *in vivo*-System sind (**Abb. 2**).

Zur BHS existieren *in vitro*-Zellkulturmodelle aus verschiedenen Spezies, die auch bereits seit geraumer Zeit zur Untersuchung des Pharmatransportes über die BHS eingesetzt werden^[8]. Primärkulturen unter Zugabe bestimmter Mediumbestandteile wie z. B. Glucocorticoide besitzen auch in Kultur die wesentlichen Transportmerkmale der BHS^[9, 10]. Das von uns etablierte Primärkultursystem aus dem Schwein zeichnet sich durch eine der *in vivo*-Situation vergleichbaren Barriere und damit durch eine geringe Leckpermeabilität aus. Dieses Kulturmodell ist insbesondere für Transportuntersuchungen an der



▲ **Abb. 2:** Cerebrale Endothelzellen des Schweins als *in vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke. **A**, Phasenkontrastaufnahme einer konfluenten Zellmonoschicht. **B**, Immunfluoreszenz des *tight junction*-spezifischen Proteins Occludin als Nachweis dichter Zell-Zell-Kontakte. **C**, Aufbau des Modellsystems. Die Endothelzellen der kapillaren Blutgefäße werden isoliert und auf Filtern kultiviert. Die Polarität der Zellen hinsichtlich Blutseite (apikal) und Hirnseite (basolateral) bleibt erhalten.



▲ **Abb. 3:** Gewebeschnitte von Mäusen, die an einer der Metachromatischen Leukodystrophie vergleichbaren Erkrankung leiden. Das gespeicherte Sulfatid ist blau gefärbt. **A, B**, Rückenmark. **C, D**, Hirnstamm. **A, C**, scheinbehandelte Kontroll-Tiere. **C, D**, Mäuse, denen in einwöchigem Abstand viermal 20 mg/kg Körpergewicht rekombinante Arylsulfatase A injiziert wurde. In den behandelten Tieren ist eine Reduktion des Speichermaterials zu sehen. Bilder aus einer Kooperation mit Prof. R. Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut, Universität Kiel.

BHS geeignet. Das System soll eingesetzt werden, um die blutseitige Aufnahme und die hirnseitige Abgabe von lysosomalen Enzyme im Hinblick auf die molekularen Mechanismen des Transports zu analysieren. Eine Verbesserung der Therapiemöglichkeiten für lysosomale Speichererkrankungen setzt voraus, dass mögliche Transzytosewege der Enzyme über die BHS besser verstanden werden. Diese wollen wir im Detail an einem Zellkultursystem untersuchen, welches die BHS *in vitro* möglichst authentisch nachbildet.

Die Metachromatische Leukodystrophie

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Erkrankung, bei der fast ausschließlich das Nervensystem betroffen ist. Sie wird durch die Defizienz der Arylsulfatase A (ASA) verursacht. Die ASA katalysiert den ersten Schritt im Abbauweg des Sulfatides, nämlich die Desulfatierung des Galaktoserestes dieses Sphingolipides. Sulfatid findet sich insbesondere in den Myelinscheiden des Nervensystems. Die Speicherung des Lipides in den myelinproduzierenden Oligodendrozyten und Schwann-Zellen führt zu einem progredienten Verlust des Myelins, was zu einer Vielzahl von neurologischen, schließlich letalen Symptomen führt. Für diese Erkrankung gibt es zurzeit keine ursächliche Therapie. In Zusammenarbeit mit dem dänischen Start-Up Biotechunternehmen Zymenex wurde ASA rekombinant produziert und ASA-defizienten Mäusen als einem Modell der MLD intravenös injiziert. Bei mehrfacher Verwendung sehr hoher Enzymdosen (bis zu 50 mg/kg Körpergewicht) konnte bei den behandelten Tieren überraschenderweise auch eine Reduktion der Sulfatidspeicherung im Gehirn festgestellt werden^[11] (**Abb. 3**). Bei niedrigeren Dosen war kein Effekt im Gehirn nachzuweisen. In der Folge dieser Tierversuche wurde eine klinische Phase I/II-Studie initiiert, die zurzeit an einer dänischen Klinik läuft. Diese erste Studie wird

allerdings mit niedrigen Enzymdosen durchgeführt. Ergebnisse liegen noch nicht vor.

Messungen der Transzytose lysosomaler Enzyme in BHS-Modellen werden dadurch erschwert, dass auch die dabei verwendeten Zellen lysosomale Enzyme synthetisieren. Diese endogenen Enzyme erzeugen eine hohe Hintergrundaktivität, die Untersuchungen zur Transzytose erschwert. Wir haben daher einen sehr empfindlichen, auf einem monoklonalen Antikörper basierenden ELISA entwickelt, der spezifisch nur die rekombinante humane ASA erfasst und nicht die von den Schweinezellen synthetisierte. Dieser ELISA erzeugt nur ein äußerst geringes Hintergrundsignal und erlaubt selbst sehr geringe Enzymmengen, die über die Zellen transportiert werden, zuverlässig zu quantifizieren.

Die Verfügbarkeit großer Mengen rekombinanter ASA, die ebenso spezifischen wie sensitiven Nachweisverfahren der ASA und die Eignung des porcinen Kulturmodells cerebraler Endothelien machen dieses Enzym und damit die MLD zu einem idealen Kandidaten für detaillierte Untersuchungen zur Transzytose lysosomaler Enzyme über die BHS. Ergebnisse können nicht nur zu einer Optimierung der Therapie lysosomaler Speichererkrankungen führen. Die Möglichkeit Proteine zu therapeutischen Zwecken in das Gehirn einzubringen, würde auch neue Therapieoptionen für weit häufigere Erkrankungen des Nervensystems eröffnen.

Danksagung

Unsere Arbeiten wurden von der DFG, dem BMBF, der European Leukodystrophy Association und der Eva Luise und Horst Köhler Stiftung unterstützt. ■

Literatur

- [1] Futerman, A. H., van Meer, G. (2004): The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 554–565.
- [2] Burrow, T. A., Hopkin, R. J., Leslie, N. D., Tinkle, B. T., Grabowski, G. A. (2007): Enzyme reconstitution/replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Curr. Opin. Pediatr.* 19: 628–635

- [3] Abbott, N. J. (2005): Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25: 5–23.
- [4] Begley, D. J., Brightman, M. W. (2003): Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog. Drug Res.* 61: 39–78.
- [5] Rocces, D. P., Lüllmann-Rauch, R., Peng, J., Balducci, C., Andersson, C., Tollersrud, O., Fogh, J., Orlicchio, A., Beccari, T., Saftig, P., von Figura, K. (2004) Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice: a preclinical animal study. *Hum. Mol. Genet.* 13: 1979–1988
- [6] Vogler, C., Levy, B., Grubb, J.H., Galvin, N., Tan, Y., Kakkis, E., Pavloff, N., Sly, W. S. (2005): Overcoming the blood-brain barrier with high-dose enzyme replacement therapy in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 14777–14782
- [7] Urayama, A., Grubb, J. H., Sly, W. S., Banks, W. A. (2004): Developmentally regulated mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of a lysosomal enzyme across the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12658–12663.
- [8] Galla, H.J. (2000): Zellkulturmodelle für die Pharmaforschung. *Bioforum* 3: 123–124
- [9] Franke, H., Galla, H., Beuckmann, C. T. (2000): Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier *in vitro*. *Brain Res. Protoc.* 5: 248–256.
- [10] Weidenfeller, C., Schrot, S., Zozulya, A., Galla, H. J. (2005): Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res.* 1053: 162–174.
- [11] Matzner, U., Herbst, E., Hedayati, K. K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Schröder, S., Eistrup, C., Möller, C., Fogh, J., Gieselmann, V. (2005): Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for Metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14: 1139–1152

Korrespondenzadressen:

Prof. Dr. Hans-Joachim Galla
Institut für Biochemie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Wilhelm-Klemm-Straße 2
D-48149 Münster
Tel.: 0251-833-3201
Fax: 0251-833-3206
Gallah@uni-muenster.de

Prof. Dr. Volkmar Gieselmann
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Nussallee 11
D-53115 Bonn
Tel.: 0228-73-2411
Fax: 0228-73-2416
gieselmann@institut.physiochem.uni-bonn.de

AUTOREN



Hans-Joachim Galla

1969–1973 Studium der Chemie an der Universität Göttingen. 1975 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie und Promotion, Postdoc am MPI in Göttingen. Ab 1976 wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung Biophysik der Universität Ulm, 1978 Habilitation. 1978/79 Assistant Prof., Stanford Medical School. Ab 1979 Heisenbergstipendiat der DFG, 1983–2000 C3-Professur für Biophysikalische Chemie an der Technischen Universität Darmstadt. Seit 2000 Professur für Biochemie und Direktor des Instituts für Biochemie der Universität Münster.



Volkmar Gieselmann

Studium der Medizin in Frankfurt und Münster. 1981–1984 Postdoc im Institut für Physiologische Chemie, 1984–1986 Assistenzarzt in der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universität Münster. 1986–1988 Postdoc, Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston. 1988–1993 Postdoc, Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Göttingen, 1991 Habilitation. 1993 Stiftungsprofessur des Stifterverbandes für die Deutsche Wissenschaft, 1995–1999 Professur für Biochemie an der Universität Kiel. Seit 1999 Professur für Biochemie an der Universität Bonn.